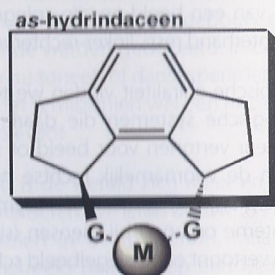


Figuur 3: Voorbeeld van een industriële asymmetrische synthese met een asymmetrische katalysator

naar enantiomeer zuivere producten vanuit o.a. de farmaceutische en agrarische sector is dan ook niet verwonderlijk. In dit licht moet de explosieve ontwikkeling van asymmetrische synthese gezien worden. Waar in de klassieke organische synthese geen onderscheid gemaakt kan worden tussen beeld en spiegelbeeld en dus een mengsel van beide bekomen wordt, wil men in asymmetrische synthese, naar het voorbeeld van de natuur, selectief één enantiomeer verkrijgen.

Asymmetrische katalysatoren vormen hierin een groot potentieel omdat het mogelijk is om vanuit één katalyserende chirale molecule, duizenden chirale productmoleculen te creëren.<sup>2</sup> (Figuur 2) Pionierswerk in dit onderzoeksgebied werd in 2001 beloond met de Nobelprijs chemie.<sup>3</sup> Vooral chemische katalysatoren laten vanwege hun modulaire opbouw, in de meeste gevallen bestaande uit een centraal metaal-atoom en een chiraal organisch ligand, een grote speelruimte voor modificatie. Variatie van het ligand kan leiden tot grote verschillen in activiteit en selectiviteit en leidt theoretisch tot een oneindig aantal nieuwe systemen. Het besef dat een universeel ligand voor asymmetrische katalyse een utopie is, enerzijds door de brede waaier aan prochirale substraten, anderzijds door de verscheidenheid aan katalytische reacties, onderstreept de nood aan een grote structurele diversiteit van liganden om een nog bredere toepassing mogelijk te maken. De selectie van het juiste ligand voor het juiste substraat uit een grote collectie liganden werpt zijn vruchten af nu asymmetrische katalyse zijn weg begint te vinden in de industriële synthese van fijnchemicaliën (Figuur 3).<sup>5</sup>

In ons labo werken we aan de ontwikkeling van nieuwe chirale enantiomeer zuivere liganden. Een voorbeeld is gebaseerd op het *as*-hydrindaceen skelet (Figuur 4). Juiste positionering van twee chelaterende (metaal-bindende) groepen leidt tot een rigide systeem dat mogelijk in de katalytische cyclus selectief zijn chiraliteit kan overdragen op een prochiraal substraat.



Figuur 4 Chirale liganden met een *as*-hydrindaceen skelet G = amine, imine, fosfine

### Referenties:

- 1) a) U.J. Meierhenrich W.H.P. Thiemann Orig. Life Evol. Biosphere 2004, 34, 111-121, b) J. Podlech Cell. Mol. Life Sci. 2001, 58, 44-60
- 2) a) B.M. Trost Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 5348-5355  
b) Ojima, I. Catalytic Asymmetric Synthesis, 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, 2000.
- 3) <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2001/index.html>
- 4) Blaser H.-U Adv. Synth. Catal. 2002, 344, 17
- 5) Blaser H.-U Chem. Commun. 2003, 293-296

## Contraststoffen voor magnetische resonantie beeldvorming (MRI)

Kristof Kimpe, Tatjana N. Parac-Vogt, Koen Binnemans

Katholieke Universiteit Leuven, Departement Chemie, Laboratorium voor Coördinatiechemie, Celestijnenlaan 200F, 3001 Leuven

### 1. Inleiding

De introductie van *magnetische resonantie beeldvorming* (MRI of magnetic resonance imaging) leidde begin jaren tachtig, mede dankzij de ontwikkelingen in de computertechnologie, tot een ware revolutie in de medische diagnose. MRI brengt niet alleen de structuur van weefsels in beeld maar laat ook hun werking zien, bijvoorbeeld de pompfunctie van het hart of het gebrek daaraan na een infarct.

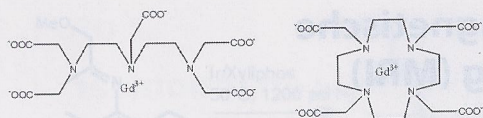
De uitvinders van de MRI-techniek, de Brit Sir Peter Mansfield en de Amerikaan Paul Lauterbur, hebben de principes van NMR (nucleaire magnetische resonantie) aangewend om beelden van het inwendige lichaam van een patiënt te genereren en ontvingen voor deze bijdrage in 2003 de Nobelprijs voor Geneeskunde toebedeeld. Met behulp van deze techniek kunnen vandaag zowat alle mogelijke weefseltypen van het menselijk lichaam in beeld worden gebracht.

MRI maakt handig gebruik van de grote hoeveelheid water in het menselijk lichaam. Als waterstofkernen in een sterk magneetveld worden gebracht, zullen ze een precessiebeweging uitvoeren met een frequentie die afhangt van de magnetische veldsterkte. Als vervolgens de waterstofkernen worden bestraald met radiogolven van dezelfde frequentie als de precessiebeweging, komen de kernen in resonantie en gaan energie absorberen. Indien het magneetveld wordt opgeheven, zullen de protonkernen de geabsorbeerde energie terug uitzenden, waardoor ze relaxeren. De meting

van de afnamesnelheid van de uitgestraalde radiofrequentie-intensiteit van de waterprotonen in vooraf bepaalde volume-elementen en toewijzing van een bepaalde kleur of grijswaarde aan iedere relaxatiesnelheid, levert een beeld. Doordat de relaxatiesnelheid van waterprotonen weefselafhankelijk is, kunnen de verschillende weefseltypen worden onderscheiden.

Met behulp van contraststoffen kan de kwaliteit van de verkregen beelden sterk verbeterd worden, waardoor een specifiekere diagnose mogelijk is. Het gebruik van paramagnetische stoffen, om de magnetische relaxatiesnelheid van waterprotonen te verhogen, heeft dan ook een brede toepassing in de magnetische resonantie beeldvorming gevonden. De aandacht gaat hierbij voornamelijk naar complexen van het driewaardige gadolinium-ion,  $Gd^{3+}$ . Dit metaalion heeft zowel een groot magnetisch moment als een lange elektronische relaxatietijd. Deze twee eigenschappen dragen bij tot een optimale efficiëntie voor de relaxatie van de interagerende waterprotonen. Omdat vrije gadolinium-ionen toxisch zijn bij de concentratie vereist voor medische beeldvorming, dient men dit ion te complexeren met een sterk bindend organisch ligand. De gadolinium complexen van de sterk lanthanidebindende DOTA- en DTPA-liganden waren de eerste verbindingen die klinisch werden toegepast als contraststoffen (respectievelijk onder de merknamen Dotarem® en Magnevist® zie figuur 1) en ze worden dan ook als referentie gebruikt voor de ontwikkeling en evaluatie van nieuwe contraststoffen.





Figuur 1: Structuren van Gd(DTPA)<sup>3-</sup> (Magnevist®, links) en Gd(DOTA)<sup>-</sup> (Dotarem®, rechts).

Het huidig onderzoek van MRI contraststoffen, richt zich voornamelijk naar het vinden van weefsel-specifieke contraststoffen (bijvoorbeeld necrosespecifieke stoffen of tumorspecifieke stoffen), contraststoffen met een relatief lange retentietijd in de bloedvaten en contraststoffen met een lagere werkzame dosis.

## 2. Ontwikkeling van nieuwe contraststoffen

De ontwikkeling van nieuwe contraststoffen voor magnetische resonantie beeldvorming is een complexe activiteit: enerzijds vergt dit kennis van organische en anorganische chemie om de synthese te kunnen verwezenlijken en daarnaast is een expertise op het gebied van fysicochemie (bij het *in vitro* evalueren van de efficiëntie van de stof) en farmacologie (bij het *in vivo* evalueren van de stof) geen overbodige luxe.

Theoretische modellen suggereren dat contraststoffen efficiënter zijn indien men erin slaagt om de contraststofmoleculen trager te laten bewegen in oplossing. De parameter die beweging in oplossing beschrijft, wordt de "rotationele correlatietijd ( $\tau_R$ )" genoemd; Hiermee wordt het tijdsinterval tussen twee opeenvolgende oriëntaties van de molecule in oplossing bedoeld (hoe groter dit tijdsinterval, hoe trager de molecule in oplossing ronddraait).

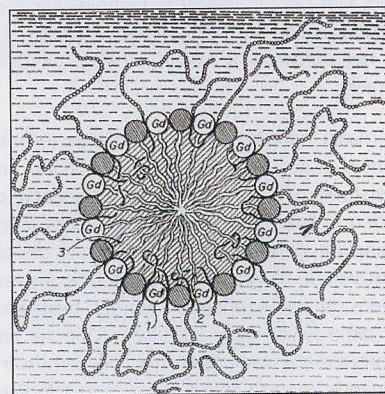
Er bestaan verschillende benaderingen om de rotationele correlatietijd te vergroten, onder andere door middel van synthese van contraststoffen op basis van dendrimeren, of van lineaire polymeren, of door het covalent binden van contraststoffen aan proteïnen. De verhoging van het contrasteffect bleek bij deze

strategieën echter lager dan verwacht, als gevolg van interne flexibiliteit van de molecules.

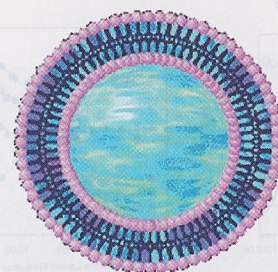
## 3. Incorporatie van amfifiele DTPA-derivaten in micellen

Er werden in het kader van het doctoraatsonderzoek van Kristof Kimpe een aantal andere strategieën om tot een grotere moleculaire rotationele correlatietijd te komen, ontwikkeld en getest. In eerste instantie ging de aandacht uit naar het inbouwen van gepaste contrastmoleculen in gemengde micellen (figuur 2a).

Incorporatie in de micel zou er dan voor zorgen dat de contrastmoleculen efficiënt geïmmobiliseerd worden, wat resulteert in een verhoging van relaxatie-efficiëntie. Hiertoe werden drie verschillende types van amfifiele derivaten van het DTPA-ligand bereid (figuur 3a-c). Deze verschillende types werden bereid door (a) het linken van DTPA met twee *n*-alkylaminoketens (verbindingen I<sub>a-c</sub>, figuur 3a); (b) het centraal linken van DTPA met één *n*-alkyl amino keten (verbindingen II<sub>a-c</sub>, figuur 3b) en (c) het linken van DTPA met twee ketens die een zijgroep dragen (verbindingen III<sub>a-c</sub>, figuur 3c). Deze liganden werden vervolgens gecombineerd met het paramagnetisch Gd<sup>3+</sup> metaalion ten-



Figuur 2a: Schematische voorstelling van een gemengde micel of: 1+2: paramagnetisch metaalcentrum (1), ge-complexiseerd met een amfifiel DTPA-derivaat (2), 3: DPPC fosfolipide, 4: nietionische surfactant.

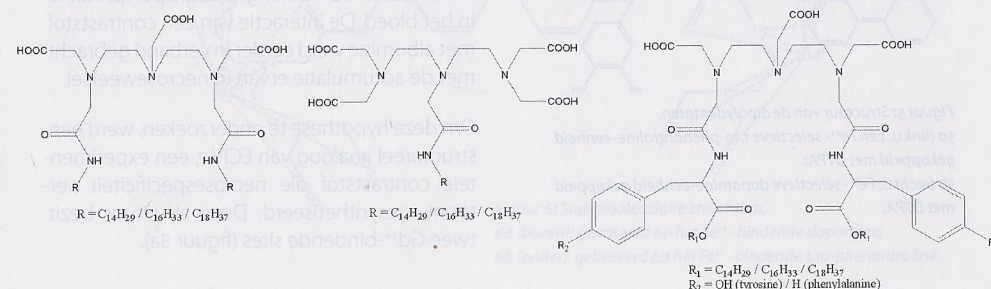


Figuur 2b: Schematische voorstelling van een liposoom: een celvormige structuur bestaande uit een dubbellaag van fosfolipiden die een waterig compartiment omvat.

einde de "ruwe contraststof" te bekomen. Deze werd vervolgens gebruik om in micellen te incorporeren.

Door middel van ultrasoonbestraling werden uit een waterig mengsel van contraststof, een niet-ionische surfactant en een fosfolipide (dipalmitoylphosphatidylcholine of DPPC) monodisperse gemengde micellen gevormd (i.e. micellen met een uniforme grootteverdeling). De aanwezigheid van een zijgroep blijkt de vorming van monodisperse micellen te verhinderen zodat voor deze verbindingen geen micellen konden verkregen worden. Deze laatste konden echter wel succesvol in liposomen worden geïncorporeerd (kunstmatige celvormige structuren bestaande uit een dubbellaag van fosfolipiden die een centraal watervolume omsluiten, zie figuur 2b).

Figuur 3: Structuren van de drie types van amfifiele DTPA-derivaten. 3a (links): *n*-alkylamino-bisamidederivaten 3b (midden): *n*-alkylamino monoamidederivaten 3c (rechts): op aminozuurester gebaseerde DTPA-bisamidederivaten.



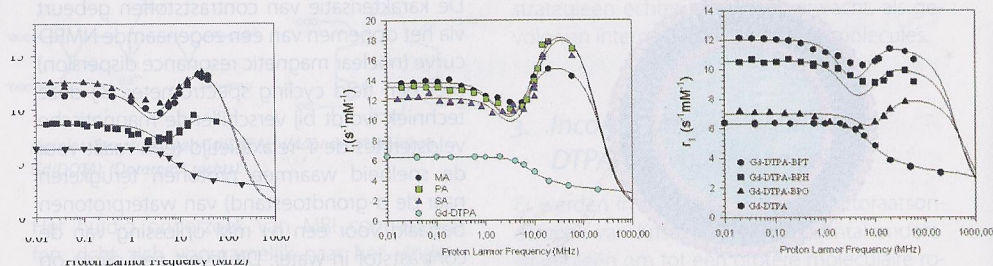
De karakterisatie van contraststoffen gebeurt via het opnemen van een zogenaamde NMCD-curve (nuclear magnetic resonance dispersion) met een field cycling spectrometer. Bij deze techniek wordt bij verschillende magnetische veldsterktes de  $T_1$ -relaxatietijd (een maat voor de snelheid waarmee protonen terugkeren naar de  $\alpha$ -grondtoestand) van waterprotonen bepaald voor een 0.1 mM oplossing van de contraststof in water. Dit levert een curve op die na fitting informatie oplevert over de verschillende parameters die de efficiëntie van de contraststof bepalen.

NMCD data van zowel gemengde micellen met verbindingen I en II, als van liposomen met verbindingen III<sub>a-c</sub> tonen aan dat de  $T_1$ -relaxatietijd overall significant hoger is dan het commercieel gebruikte Gd-DTPA (zie figuur 4). Deze verhoging wordt veroorzaakt door een efficiënte immobilisatie van de "ruwe contraststof" in micellen of liposomen.

## 4. Zelf assemblerende heteropolymetallische chelaten

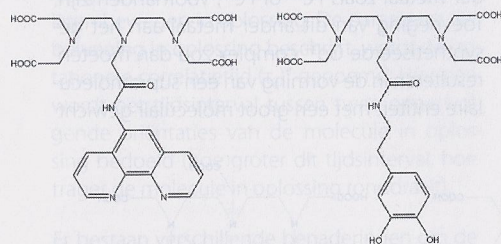
Een andere benadering om tot betere contraststoffen te komen, bestaat erin gebruik te maken van supramoleculaire zelf-assemblage. Dit kan verwezenlijkt worden door het ligand zo te kiezen dat er naast voldoende coördinatieplaatsen voor het Gd<sup>3+</sup> ion, ook sites voor een ander metaal zoals Fe<sup>2+</sup> of Fe<sup>3+</sup>, voorhanden zijn. Toevoeging van dit ander metaal aan het gesynthetiseerde Gd<sup>3+</sup> complex zou dan moeten resulteren in de vorming van een supramoleculaire entiteit met een groot moleculair gewicht





**Figuur 4:** NMRD-curves van de verschillende types contraststoffen (bij 37°C).  
 4a (links): Op *n*-alkylamino DTPA-bisamide gebaseerde gemengde micellen;  
 4b (midden): Op *n*-alkylamino DTPA-monoamide gebaseerde gemengde micellen;  
 4c (rechts): Op aminozuur ester DTPA-bisamide gebaseerde liposomen.  
 De NMRD-curve van Gd(DTPA)<sup>3+</sup> is telkens toegevoegd als referentie (onderste curves).

én meerdere paramagnetische centra. Om dit te bewerkstelligen werden zogenaamde dipolydentaatliganden ontworpen (organische liganden die in staat zijn om twee verschillende metalen te binden). Er werd geopteerd voor liganden die enerzijds hetzij Fe<sup>2+</sup> (d.m.v. de koppeling van DTPA met een fenantroline-eenheid, figuur 5a), hetzij Fe<sup>3+</sup> (d.m.v. de koppeling van DTPA met een catechol-eenheid, figuur 5b) konden binden en anderzijds een driewaardig lanthanide-ion. Eerst werden de dipolydentaatliganden gecomplexeerd met Gd<sup>3+</sup>. Hierna werden de supramoleculaire structuren op eenvoudige wijze bekomen door ze aan een waterige oplossing van een passende hoeveelheid Fe<sup>2+</sup> of Fe<sup>3+</sup> toe te voegen (figuur 6 a-b).



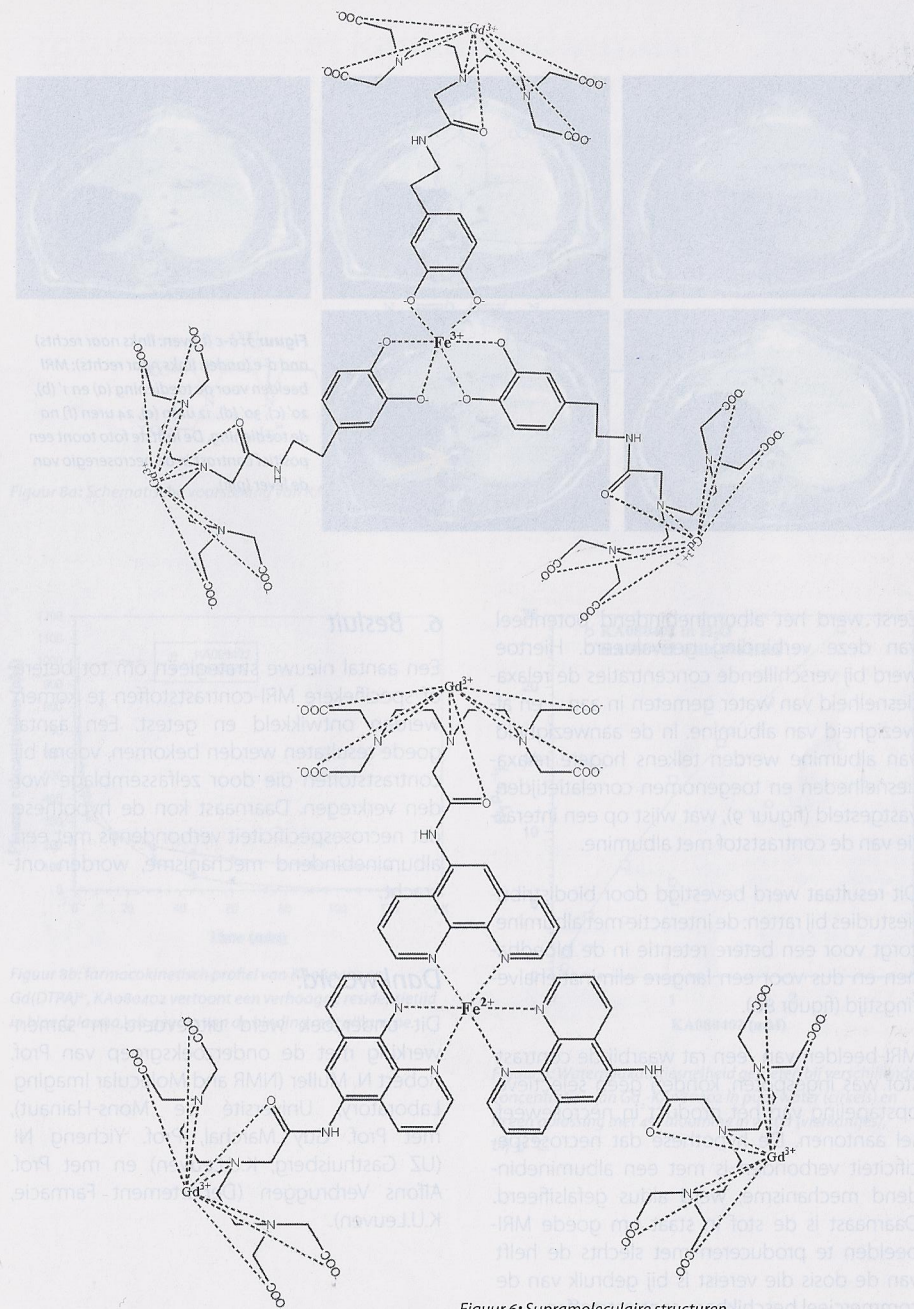
**Figuur 5:** Structuur van de dipolydentaten.  
 5a (links): Een Fe<sup>2+</sup>-selectieve 1,10-phenantroline-eenheid gekoppeld met DTPA;  
 5b (rechts): Fe<sup>3+</sup>-selectieve dopamine-eenheid gekoppeld met DTPA.

De *in vitro* karakterisatie met NMRD leverde uitstekende resultaten op, als gevolg van de aanwezigheid van drie paramagnetische Gd<sup>3+</sup> metaal-ionen en één paramagnetisch ijzer-ion enerzijds, en anderzijds de toename van het molecuulair gewicht door de assemblage. Verder werd de supramoleculaire structuur gebaseerd op de 1,10-fenantroline-eenheid ook *in vivo* getest op een rat waarin levernecroseweefsel (dood weefsel) werd geïnduceerd. Hieruit bleek dat deze verbinding een lange retentietijd in necroseweefsel bezit (figuur 7) en dus potentieel gebruikt kan worden bij de diagnose van een myocard infarct, een veel voorkomende aandoening in geïndustrialiseerde landen.

## 5. Studie van de verbinding KA080402

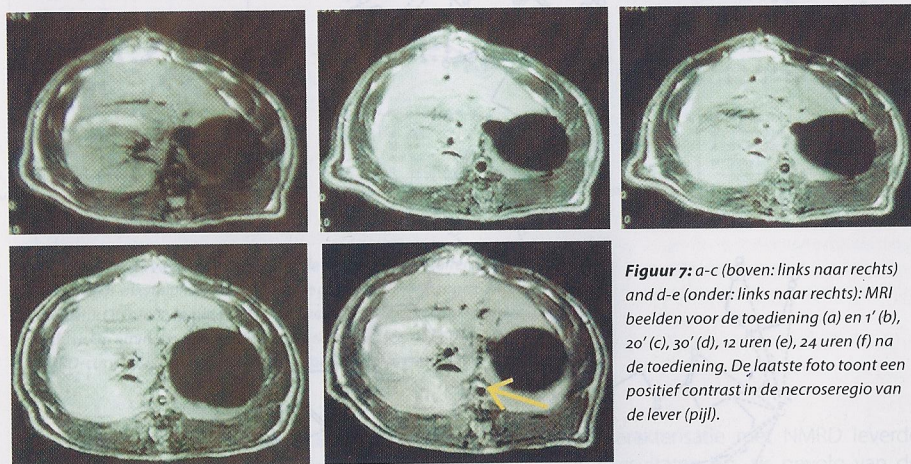
Albumine is een belangrijk transportproteïne in het bloed. De interactie van een contraststof met albumine werd eerder in verband gebracht met de accumulatie ervan in necroseweefsel.

Om deze hypothese te onderzoeken, werd een structureel analoog van ECIV-7, een experimentele contraststof die necrosespecificiteit vertoont, gesynthetiseerd. Deze structuur bezit twee Gd<sup>3+</sup>-bindende sites (figuur 8a).



**Figuur 6:** Supramoleculaire structuren.  
 6a (boven): gebaseerd op het Fe<sup>2+</sup>-bindende dopamine,  
 6b (onder): gebaseerd op het Fe<sup>2+</sup>-bindende 1,10-phenantroline.





**Figuur 7:** a-c (boven: links naar rechts) and d-e (onder: links naar rechts): MRI beelden voor de toediening (a) en 1' (b), 20' (c), 30' (d), 12 uren (e), 24 uren (f) na de toediening. De laatste foto toont een positief contrast in de necroseregio van de lever (pijl).

Eerst werd het albuminebindend potentieel van deze verbinding geëvalueerd. Hiertoe werd bij verschillende concentraties de relaxatiesnelheid van water gemeten in aan- en afwezigheid van albumine. In de aanwezigheid van albumine werden telkens hogere relaxatiesnelheden en toegenomen correlatietijden vastgesteld (figuur 9), wat wijst op een interactie van de contraststof met albumine.

Dit resultaat werd bevestigd door biodistributiestudies bij ratten: de interactie met albumine zorgt voor een betere retentie in de bloedbanen en dus voor een langere eliminatiehalveringstijd (figuur 8b).

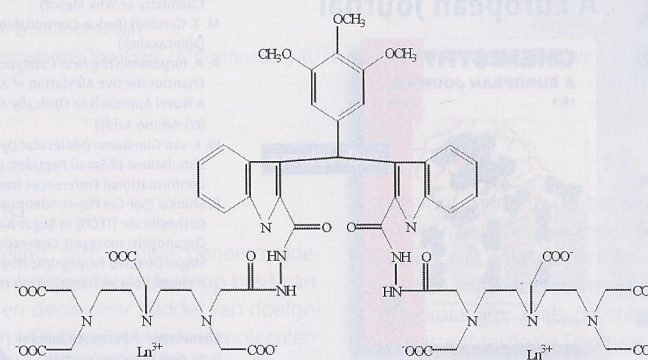
MRI-beelden van een rat waarbij de contraststof was ingespoten, konden geen selectieve opstapeling van het product in necroseweefsel aantonen. De hypothese dat necrosespecificiteit verbonden is met een albuminebindend mechanisme, werd aldus gefalsificeerd. Daarnaast is de stof in staat om goede MRI-beelden te produceren met slechts de helft van de dosis die vereist is bij gebruik van de commercieel beschikbare contraststoffen.

## 6. Besluit

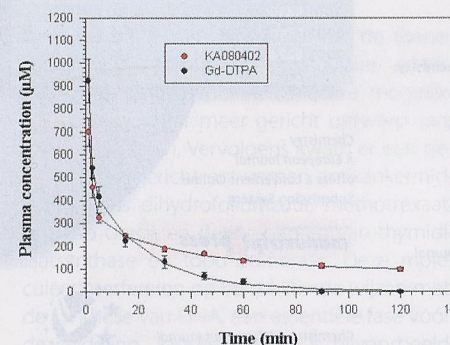
Een aantal nieuwe strategieën om tot betere of specifiekere MRI-contraststoffen te komen werden ontwikkeld en getest. Een aantal goede resultaten werden bekomen, vooral bij contraststoffen die door zelfassemblage worden verkregen. Daarnaast kon de hypothese dat necrosespecificiteit verbonden is met een albuminebindend mechanisme, worden ontkracht.

## Dankwoord:

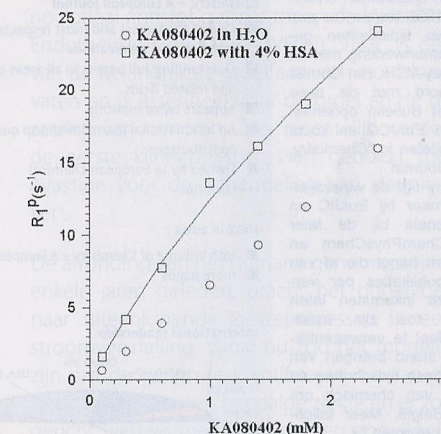
Dit onderzoek werd uitgevoerd in samenwerking met de onderzoeksgroep van Prof. Robert N. Muller (NMR and Molecular Imaging Laboratory, Université de Mons-Hainaut), met Prof. Guy Marchal, Prof. Yicheng Ni (UZ Gasthuisberg, K.U.Leuven) en met Prof. Alfons Verbruggen (Departement Farmacie, K.U.Leuven).



**Figuur 8a:** Schematische voorstelling van KAO80402.



**Figuur 8b:** farmacokinetisch profiel van KAO80402 en Gd(DTPA)<sup>3+</sup>; KAO80402 vertoont een verhoogde residentietijd in bloedplasma, als gevolg van de binding met albumine.



**Figuur 9:** Waterrelaxatiesnelheid gemeten bij verschillende concentraties van Gd<sup>3+</sup>-KAO80402 in puur water (cirkels) en in een oplossing met 4% albumine in water (vierkantjes), bij 37 °C.